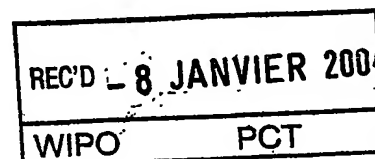


**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

EP 03/12531

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 16 059.0

**Anmeldetag:** 08. April 2003

**Anmelder/Inhaber:** Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt  
am Main, Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Plazentaler-Wachstumsfactor (PIGF) als biochemi-  
scher Marker bei kardiovaskulären Erkrankungen

**IPC:** G 01 N 33/53

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. November 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
im Auftrag

  
Slecker**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**BEST AVAILABLE COPY**

### Plazentaler-Wachstumsfaktor (PlGF) als biochemischer Marker bei kardiovaskulären Erkrankungen

Die Erfindung betrifft einen neuen Marker der vaskulären Entzündung als Werkzeug zur Diagnose und deren Prognose in Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen. Der Marker dient weiterhin als ein Werkzeug, das die Auswahl von Wirkstoffen zur Behandlung solcher Erkrankungen erleichtert und schließlich als Ansatzpunkt für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Erstellung eines individuellen Risikoprofils von negativen Vorgängen, die mit dem Fortschreiten der Arteriosklerose zusammenhängen.

#### Hintergrund der Erfindung

Kürzliche Fortschritte in der Grundlagenforschung haben eine fundamentale Rolle für die Entzündung bei der Vermittlung aller Phasen der Arteriosklerose, von ihrem Beginn über Fortschreiten und, letztendlich, den thrombotischen Komplikationen von arteriosklerotischen Läsionen etabliert [1-4]. Die aus dem Zusammenhang zwischen Entzündung und Arteriosklerose erhaltenen Ergebnisse bilden die Rationale zur Verwendung von zirkulierenden Entzündungsmarkern als potentielle prädiktive Instrumente bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen. In der Tat gehen erhöhte Spiegel von Entzündungsmarkern, wie zum Beispiel hochsensitives C-reaktives Protein (hsCRP), Serum Amyloid A, und Interleukin-6 (IL-6) nicht nur allgemein mit akuten Koronarsyndromen einher [5,7], sondern – was wichtiger ist – können auch eine Aussage über den klinischen Ausgang von Patienten mit akuten Koronarsyndromen vorhersagen [6, 8, 11]. Obwohl das "klassische" akute Phase Protein hsCRP als der am meisten versprechende Biomarker für klinische Zwecke angesehen wird, besteht eine substantielle Heterogenität im Hinblick auf die Prävalenz von erhöhten hsCRP Spiegel in Patienten mit akuten Koronarsyndromen [12].

So zeigen mehr als 30 % der Patienten mit schwerer instabiler Angina keine erhöhten hsCRP Spiegel [6, 9]. Darüber hinaus können individuelle Unterschiede im Ausmaß der Response auf bestimmte entzündliche Stimuli möglicherweise die Spiegel der "stromabwärts" akute-

Phase Reaktanten, wie hsCRP beeinflussen [13, 14]. Daher besteht immer noch eine wichtige Herausforderung darin, proximale Stimuli für vaskuläre Entzündung zu identifizieren, die als Risiko-vorhersagende Serummarker in Patienten mit koronarer Arteriosklerose verwendet werden können.

Die Etablierung der korrekten Diagnose, verbunden mit einer geeigneten Behandlung von Patienten mit instabilen koronaren Herzerkrankungen kann eine Herausforderung sein. Der Ausschluß von akuten Myokardinfarkten nach heutigen Standards ist nicht zufriedenstellend. In den letzten Jahren hat eine Konzentration auf die Risikostratifizierung und Steuerung der Behandlung stattgefunden mit dem Ziel, Patienten zu identifizieren, bei denen das Risiko besteht, lebensbedrohliche kardiologische Ereignisse zu entwickeln, und die vor allem von verbesserten therapeutischen und intervenierenden Strategien profitieren (Hamm CW, Bertrand M, Braunwald E. Lancet 2001; 358:1533-8). Das EKG hat in dieser Hinsicht nur begrenzte prognostische Relevanz, da bedeutende Abnormitäten selten sind und ihr Nachweis wenig empfindlich und spezifisch ist (Kaul P, Fu Y, Chang WC, et al., J Am Coll Cardiol 2001; 38:64-71 und Savonitto S, Ardissino D, Granger CB, et al. JAMA 1999; 281:707-13).

Deshalb haben sich Marker einer Nekrose von Myokardzellen, vor allem kardiale Troponine, zu wertvollen Werkzeugen bei der Evaluierung von Patienten mit akuten koronaren Syndromen entwickelt (Hamm CW, Braunwald E. Circulation 2000; 102:118-22). Troponine sind allerdings nicht aktiv an der Pathophysiologie akuter koronarer Syndrome beteiligt, sondern stellen eher eine Art Surrogat-Marker für die fragile Thrombusbildung dar (Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, Venge P, Wallentin L. J Am Coll Cardio. 2001; 38:979-86, Heeschen C, van Den Brand MJ, Hamm CW, Simoons ML. Circulation 1999; 100:1509-14; Benamer H, Steg PG, Benessiano J, et al.. Am Heart J 1999; 137:815-20).

Entzündungsmarker, welche die Aktivität der Erkrankung bestimmen, möglichst bevor eine Myokardnekrose auftritt, könnten wichtige zusätzliche Informationen für die diagnostische und therapeutische Stratifizierung bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen darstellen. Die spezifische therapeutische Inhibierung von Cytokinen, die für die Plaque-Stabilität wesentlich sind, mag eine neue Behandlungsstrategie für Patienten mit instabiler und stabiler koronarer Herzerkrankung sein.

Ein zuverlässiger biochemischer Marker der Entzündung in diesem Zusammenhang wurde aber bis heute nicht identifiziert.

Von Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF), einem Mitglied der vaskulären-Endothel-Wachstumsfaktor-Familie (VEGF-Familie) von Wachstumsfaktoren, wurde kürzlich gezeigt, daß dieser in frühen und fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen hoch-reguliert ist.

Die US 6,225,088 beschreibt PlGF im Zusammenhang mit proliferativen Erkrankungen, wohingegen in der WO 92/06194 PlGF als angiogenetischer Faktor beschrieben wird.

De Falco et al. (De Falco S, Gigante B, Persico MG. "Structure and function of placental growth factor" Trends Cardiovasc Med 2002 Aug;12(6):241-6) beschreiben den Zusammenhang beeinträchtigter Angiogenese und Arteriogenese während pathologischer Zustände, wie zum Beispiel Ischämie und Tumorbildung in Mäusen. Dabei wird PlGF als ein wesentlicher Faktor für die Angiogenese unter pathologischen Bedingungen beschrieben. PlGF wird als alternatives Ziel für eine angiogenetische Therapie vorgeschlagen.

Luttun et al. (Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compemolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumour angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 Nat Med 2002 Aug;8(8):831-40) beschreiben therapeutische Verfahren von PlGF und Flt-1 im Rahmen der Angiogenese. Weiterhin wird beschrieben, daß Hemmung von PlGF das Wachstum und die Verletzlichkeit von arteriosklerotischen Plaques verringert.

Oura et al. (Oura H, Bertoncini J, Velasco P, Brown LF, Carmeliet P, Detmar M. A critical role of placental growth factor in the induction of inflammation and edema formation. Blood 2003 Jan 15;101(2):560-7) beschreiben die Rolle von PlGF bei kutaner Entzündung und Angiogenese. Weiterhin werden die Effekte von erhöhten und verringerten Spiegeln von PlGF und deren Vergleich mit dem Status der Entzündung beschrieben.

Im Hinblick auf das oben Genannte ist es somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem das Risiko, ein kardiovaskulär nachteiliges Er-

ereignis, bedingt durch Koronarthrombose, mit Hilfe eines individuellen Risikoprofils abgeschätzt werden kann. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist weiterhin, ein Verfahren zur Evaluierung der Wahrscheinlichkeit, daß eine Behandlung mit einem Wirkstoff zur Hemmung des plazentalen Wachstumsfaktors (PlGF) von Vorteil ist, zu entwickeln. Mit Hilfe dieses Verfahrens soll der behandelnde Arzt besser als bisher in die Lage versetzt werden, geeignete Maßnahmen auswählen zu können, um den Patienten positiv zu beeinflussen und/oder ein nachteiliges Ereignis zu verhindern oder zumindest in seiner Schwere für den betroffenen Patienten zu vermindern.

Gemäß der Erfindung wird eine erste Aufgabe durch ein Verfahren zur Analyse von biologischen Proben in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen gelöst. Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt die Schritte von: (a) Gewinnung einer zu untersuchenden biologischen Probe von einem Patienten; (b) Inkubieren der Probe mit einem oder mehreren Molekülen, die spezifisch an PlGF binden; (c) Nachweisen und/oder quantifizieren von PlGF in der Probe unter Verwendung immunologischer Methoden; und (d) Vergleichen des für die zu untersuchende Probe erhaltenen Ergebnisses mit einem Referenzwert und/oder dem Ergebnis einer Referenzprobe.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wurde PlGF als ein Marker der vaskulären Entzündung identifiziert, der unabhängig ist und dem prädiktiven Wert von CRP überlegen ist. Es zeigte sich, daß die PlGF Serumspiegel die von herkömmlichen Entzündungsmarkern in akuten Koronarsyndromen erhaltene prädiktive und prognostische Information signifikant erweitern. Ein erhöhtes Risiko von Herzpatienten mit hohen PlGF-Konzentrationen, die standardmäßig therapiert wurden, wurde durch die zusätzliche Behandlung mit einem Glycoprotein IIb/IIIa-Inhibitor aufgehoben. Die Messung von PlGF bei Patienten mit instabiler koronarer Herzerkrankung liefert wichtige Einblicke in die Aktivität der Erkrankung, das kardiale Risiko und die Wirkung einer Behandlung mittels Glycoprotein IIb/IIIa-Hemmung durch z.B. Abciximab.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die zu untersuchende Probe und/oder die Referenzprobe aus einem Säugetier, insbesondere aus dem Menschen, stammen. Weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die zu untersuchende Probe und/oder die Referenzprobe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus peripherem Blut oder Fraktionen davon und Zellkultur-Suspensionen oder Fraktionen davon. Bevorzugt ist weiterhin,

daß die untersuchende Probe und/oder Referenzprobe Blutserum oder Blutplasma ist. Besonders bevorzugt ist peripheres Vollblut als zu untersuchende Probe und/oder Referenzprobe.

Gemäß einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die zu untersuchende Probe und/oder die Referenzprobe vorbehandelt sein, wobei dem peripheren Blut z.B. ein Gerinnungshemmer, insbesondere Heparin, zugesetzt wird.

Ein wesentlicher Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Inkubation der Probe mit einem oder mehreren Molekülen, die spezifisch an PlGF oder einen Teil davon binden. Diese Moleküle können aus einer sehr großen Vielzahl von für PlGF spezifischen Molekülen ausgewählt sein. Bevorzugt ist, daß die an PlGF bindenden Moleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Antikörpern, die spezifisch gegen PlGF oder gegen Teile davon gerichtet sind, oder Teilen oder Fragmenten davon und einem PlGF-Rezeptor oder Teilen davon. Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Antikörper, Teile oder Fragmente davon polyklonale Antikörpern, monoklonale Antikörpern, Fab-Fragmente, scFv-Antikörper und Diabodies umfassen.

Gemäß eines weiteren Aspekts des Verfahrens der vorliegenden Erfindung können die Komponenten bei der Durchführung des Verfahrens an eine feste Phase gebunden vorliegen, somit können die an einen Marker bindenden Moleküle in Lösung oder Matrix-immobilisiert vorliegen. Als Matrices können eine Vielzahl von dem Fachmann bekannten Materialien verwendet werden, wie zum Beispiel Harz-Matrices und/oder herkömmliche Säulenmatrices. Besonders bevorzugt ist weiterhin ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem die an einen Marker bindenden Moleküle an eines oder mehrere Detektionsmoleküle aus der Gruppe bestehend aus Fluoresceinithioisocyanat, Phycoerythrin, Enzymen (zum Beispiel Meerrettich-Peroxidase) und magnetisches Bead gekoppelt sind.

Gemäß einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens können die an PlGF bindenden Moleküle mit einem Antikörper, an den eine oder mehrere Detektionsmoleküle gekoppelt sind, nachgewiesen werden. Es handelt sich somit um einen indirekten Nachweis der Bindung des Moleküls. Solche zweistufigen Nachweise sind dem Fachmann zum Beispiel aus der anti-Antikörper-Nachweisteknik bestens bekannt.

Gemäß einem weiteren Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung können zur Analyse der Probe immunzytologische Verfahren angewandt werden. Dabei sind alle Verfahren geeignet, die eine spezifische Bestimmung anhand der PlGF/Molekül-Interaktion erlauben. Bevorzugt sind Verfahren, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Sandwich-Enzym-Immuntest, ELISA und Festphasen-Immuntests.

Die für die zu untersuchende Probe ermittelten Ergebnisse werden üblicherweise mit einer Referenzprobe verglichen. Welche Probe als Referenzprobe dienen kann, wird insbesondere von der Art der untersuchten Probe und der Krankengeschichte des Individuums, aus dem die zu untersuchende Probe stammt, abhängen. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, bei dem die Referenzprobe aus einem oder dem Mittelwert mehrerer Säugetiere stammt, in dem/in denen eine kardiovaskuläre Erkrankung ausgeschlossen wurde. Dies muß aber nicht zwangsläufig so sein, wenn z.B. das Fortschreiten einer Erkrankung bestimmt werden soll, kann auch eine „alte“ Probe desselben Patienten als Referenzprobe verwendet werden. Dem Fachmann ist offensichtlich, welche Proben als Referenzprobe für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet sind.

Gemäß einem weiteren bevorzugten Verfahren beträgt der PlGF-Referenzwert und/oder das Ergebnis einer Referenzprobe  $> 24,9$  ng/l (95% Konfidenz). Besonders bevorzugt beträgt der Referenzwert und/oder das Ergebnis einer Referenzprobe  $> 27,0$  ng/l bis  $> 27,3$  ng/l (99% Konfidenz)

Gemäß einem weiteren Aspekt des Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung können die zu diagnostizierenden und/oder prognostizierenden und/oder deren Therapie zu überwachen- den kardiovaskulären Erkrankungen ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus stabiler und instabiler Angina, Myokardinfarkt, aktuellem Herzsyndrom, koronarer Arterienerkrankung und Herzinsuffizienz. Es soll jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich das erfindungsgemäße Verfahren noch für weitere kardiologische Erkrankungszustände eignet und anwenden läßt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen diagnostischen Kit, wobei der Kit Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, unter Umständen zusammen mit weiteren Komponenten und/oder Hilfsstoffen umfaßt. Solche Mittel sind bevorzugterweise mindestens ein Antikörper zum Nachweis von PlGF und Mittel zur anschließenden Quanti-

fizierung von PlGF. Der Kit kann außerdem andere Komponenten und/oder Enzyme zur Durchführung der Verfahren der vorliegenden Erfindung, z.B. Gebrauchsanweisungen zur Interpretation der Ergebnisse des Tests im Hinblick auf das Risikoprofil des Patienten und entsprechende Gegenmaßnahmen und Therapievorschläge enthalten.

Bevorzugt ist, das erfindungsgemäßes Verfahren mit Hilfe eines einen diagnostischer Kits durchzuführen, der Gold-markierte polyklonale Maus-Indikatorantikrper, biotinylierte polyklonale Nachweisantikörper und eine Testvorrichtung, umfassend ein Fiberglas-Vlies, umfaßt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen und/oder zur Überwachung von deren Therapie. Dies geschieht durch die quantitative und kritische Bestimmung von PlGF. Aufgrund des daraufhin erstellbaren Risiokoprofils können dann geeignete Gegenmaßnahmen durch den behandelnden Arzt durchgeführt werden, um den Patienten positiv zu beeinflussen und das nachteilige Ereignis zu verhindern oder zumindest in seiner Schwere für den betroffenen Patienten zu vermindern. Eine solche Therapie kann erfindungsgemäß zunächst die Verabreichung von Inhibitoren des Flt-1-Rezeptors umfassen, weiter bevorzugt aber auch die Verabreichung von Inhibitoren des Glycoprotein IIb/III-Rezeptors, insbesondere Abciximab, umfassen. Dem Fachmann sind jedoch weitere mögliche Therapien bekannt, um kardiovaskuläre Erkrankungen zu therapieren, die nach herkömmlichen Schemata erfolgen können. So sagt der Marker PlGF in Patienten mit instabiler Koronar-Herzerkrankung den Behandlungseffekt der Glycoprotein IIb/III-Inhibierung mit, z.B., Abciximab voraus. Das erhöhte kardiale Risiko von Patienten mit hohen PlGF Spiegeln, die Standardtherapie erhielten, wurde durch die zusätzliche Behandlung mit einem Glycoprotein IIb/IIIa-Inhibitor verringert.

Die pro-inflammatorischen Effekte von PlGF können spezifisch durch Blockieren seines Rezeptors Flt-1 inhibiert werden und stellen eine neue anti-inflammatorische therapeutische Option in Patienten mit Koronar-Arterienerkrankung zur Verfügung.

In einer früheren Analyse einer Untergruppe von Patienten der CAPTURE-Studie wurde gezeigt, daß eine zusätzliche Behandlung mit dem Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Abciximab das erhöhte Risiko Troponin-positiver Patienten auf das Maß von Troponin-



negativen Patienten reduziert (Hamm CW, Heeschen C, Goldmann B, et al.; N Engl J Med 1999; 340:1623-9). Diese Patienten stellen ungefähr 1/3 der Patienten mit akuten Koronarsyndromen dar (Hamm CW, Braunwald E; Circulation 2000; 102:118-22; Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, et al.; N Engl J Med 1996; 335:1342-9; Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, et al.; N Engl J Med 1996; 335:1333-41; Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, et al.; N Engl J Med 1992; 327:146-50; Hamm CW, Goldmann BU, Heeschen C, Kreyman G, Berger J, Meinertz T; N Engl J Med 1997; 337:1648-53). Ähnliche Befunden hinsichtlich Troponin T und Troponin I ergaben sich später aus anderen Studien (Newby LK, Ohman EM, Christenson RH, et al.; Circulation 2001; 103:2891-6; Januzzi JL, Chae CU, Sabatine MS, Jang IK; J Thromb Thrombolysis 2001; 11:211-5; Heeschen C, Hamm CW, Goldmann B, Deu A, Langenbrink L, White HD; Lancet 1999; 354:1757-62), und anschließend wurden Troponine in die neuen Richtlinien aufgenommen als Teil der Risikostratifizierung bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen (Hamm CW, Bertrand M, Braunwald E; Lancet 2001; 358:1533-8; Braunwald E, Maseri A, Armstrong PW, et al.; Eur Heart J 1998; 19:D22-30).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie etablieren den PlGF Serumspiegel als eine neue wirksame unabhängige prognostische Determinante des klinischen Ausgangs bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen. Besonders zu bemerken ist, daß in Patienten mit niedrigen hsCRP Serumspiegeln, erhöhte PlGF Serumspiegel eine Untergruppe von Patienten identifizieren, die an einem signifikant erhöhten kardialen Risiko leiden (angepaßtes Gefahren-Verhältnis 3,58 [95% CI 1,48 - 7,72];  $p = 0,001$ ).

Der prädiktive Wert von PlGF Serumspiegel ist unabhängig von Evidenz für myokardiale Nekrose, wie durch den Troponin Serumspiegel bestimmt. Zuletzt identifizieren erhöhte PlGF Serumspiegel nicht nur diejenigen Patienten mit akuten Brustschmerzen, die akute Koronarsyndrome entwickeln, sondern auch diejenigen Patienten, die an einem erhöhten Risiko von wiederkehrender Instabilität nach der Entlassung von einem anfänglichen akuten Koronarsyndrom leiden. Daher kann das Messen des PlGF Serumspiegels nicht nur ein verlässliches und wirksames klinisches Werkzeug für die Identifizierung von Patienten mit hoch-Risiko Läsions-Bildung sein, sondern auch von andauernder vaskulärer Entzündung der Koronarzirkulation.

Die Rolle von PlGF als einem primären Entzündungsmarker von arteriosklerotischer Läsions-Instabilität kann gut durch seine gut dokumentierten pro-inflammatorischen Effekte in Tiermodellen von Arteriosklerose oder Arthritis erklärt werden [15]. Obwohl PlGF zu der Familie von VEGF gehört, scheint seine ätiopathogenetische Rolle eher mit der Entzündung als mit der Angiogenese zusammenzuhängen [15]. In der Tat, während die VEGF-Erhöhung durch Hypoxie und die Erhöhung des VEGF-Serumspiegels als eine frühe Anpassung des Myokards an den abnehmenden Blutfluß angesehen werden [20], wird PlGF nicht durch Hypoxie beeinträchtigt oder herunter-reguliert [21, 22]. In Übereinstimmung mit diesen Daten, ergaben die Ergebnisse dieser Studie keine Korrelation zwischen dem PlGF Serumspiegel und dem Troponin T Serumspiegel als ein Marker von myokardialer Nekrose, wohingegen der VEGF Serumspiegel positiv mit dem Troponin T Serumspiegel korrelierte. Übereinstimmend damit korrelierte PlGF nicht mit dem VEGF Serumspiegel.

Daher scheint der PlGF Serumspiegel nicht durch myokardiale Nekrose beeinträchtigt zu werden. Im Gegenteil sind die VEGF Serumspiegel mit einer Erhöhung von Troponin T, beeinträchtigtem TIMI Fluß, und klinischen Anzeichen von myokardialer Ischämie gekoppelt [23]. Der PlGF Serumspiegel als nicht sensitiv gegenüber kleineren myokardialen Verletzungen könnte in Patienten mit akuten Koronarsyndromen spezifisch wichtig sein, von denen ungefähr ein Drittel bei Einlieferung positiv für Troponin sind [24].

Ähnlich könnte eine myokardiale Verletzung auch den Wert des hsCRP Serumspiegels kompromittieren, um so den Ausgang in Patienten mit akuten Koronarsyndromen vorhersagen zu können. Als ein klassischer unspezifischer stromabwärts akute-Phase-Marker, sind die hsCRP Serumspiegel in Patienten mit myokardialer Verletzung erhöht, wie durch Troponin T Erhöhung gemessen. Es ist gut etabliert, daß erhöhte Serumspiegel von hsCRP vor dem Auftreten eines Markers von myokardialer Nekrose in nahezu allen Patienten gefunden werden, in denen vor einem Infarkt eine instabile Angina auftritt [25]. Die Spezifität von erhöhtem hsCRP Serumspiegel, der eine verstärkte vaskuläre Entzündung bestätigt, ist daher in Anwesenheit von myokardialer Verletzung sehr begrenzt.

Daher können in Troponin-positiven Patienten erhöhte hsCRP Serumspiegel lediglich ein erhöhtes Risiko sekundär zu myokardialer Verletzung als ein Surrogatmarker für Thrombembolie darstellen, die eher von einem aktiven thrombotischen Prozeß innerhalb der kulpritischen Läsion als einer andauernden vaskulären Entzündung stammen.

Tatsächlich sind, wenn jeweils Troponin T und VEGF als Marker von myokardialer Nekrose und Ischämie in eine multivariante Analyse einbezogen werden, erhöhte hsCRP Serumspiegel nicht länger für eine erhöhtes Risiko in Patienten mit akuten Koronarsyndromen prädiktiv.

Noch wichtiger variiert die berichtete Prävalenz von erhöhtem hsCRP Serumspiegel in akuten Koronarsyndromen beträchtlich. (Mehr als 30% der Patienten mit schwerer instabiler Angina und mehr als 50% der Patienten mit einem akuten myokardialen Infarkt zeigen keine erhöhten hsCRP Serumspiegel). Erhöhte hsCRP Serumspiegel fehlen in mehr als 30 % von Patienten mit schwerer instabiler Angina und in mehr als 50 % von Denjenigen mit einem akuten myokardialen Infarkt, der nicht nach einer instabilen Angina folgt [6, 25], was eine wichtige Heterogenität der Rolle von entzündlichen Auslösern des klinischen Syndroms der koronaren Instabilität vermuten läßt [1]. Jedoch ist es auch gut etabliert, daß Individuen in ihrer systemischen Antwort auf einen bestimmten entzündlichen Stimulus variieren können [26, 27]. Die Zunahme in hsCRP oder IL-6, die in Antwort auf das durch Ballondilatation induzierte vasculäre Trauma oder sogar durch unkomplizierte Herzkatheterisierung beobachtet wurde, korreliert linear mit Basislinien hsCRP oder Interleukin-6 Serumspiegel [26]. Zusätzlich ist die IL-6 Produktion durch Monozyten, die von Patienten mit instabiler Angina isoliert werden, signifikant in Patienten mit erhöhtem hsCRP Serumspiegel erhöht, verglichen mit Patienten mit normalem hsCRP Serumspiegel [27]. Diese individuellen Unterschiede im Ausmaß der Antwort auf einen bestimmten entzündlichen Stimulus können eine genetische Ursache haben [28]. Unglücklicherweise schränken solche heterogenen Antworten die Brauchbarkeit von stromabwärts akute-Phase Reaktanten, wie zum Beispiel hsCRP, als entzündlichen Marker für die Risikoabschätzung ein. Im Gegensatz dazu scheint PlGF ein direkter proximaler Stimulus für entzündliche Prozesse innerhalb der Gefäßwand zu sein [15]. Tatsächlich waren erhöhte PlGF Serumspiegel extrem informativ spezifisch in Patienten mit akuten Koronarsyndromen, jedoch nicht nicht-erhöhte hsCRP Serumspiegel. In dieser Patientenkohorte, identifizierten erhöhte PlGF Serumspiegel eine Untergruppe von Patienten mit deutlich erhöhtem kardialen Risiko, das ähnlich zu den durch erhöhte Troponin Serumspiegel definierten hoch-Risiko Patienten war. Daher können erhöhte PlGF Serumspiegel in der Tat einen primären entzündlichen Anzeiger koronarer Instabilität darstellen.

Weiterhin könne, weil die pro-inflammatorischen Effekte von PlGF spezifisch durch Blockieren seines Rezeptors Flt-1 inhibiert werden können, diese Ergebnisse auch einen Ansatz für

ein neues anti-inflammatorisches therapeutisches Target in Patienten mit koronarer arterieller Erkrankung zur Verfügung stellen [29].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die vorliegende Studie die bedeutende und unabhängige Rolle von PlGF als einen Marker für die diagnostische und therapeutische Risikostratifizierung dokumentiert. Das erhöhte kardiale Risiko von Patienten mit hohen PlGF-Konzentrationen, die eine Standardtherapie mit Heparin und Aspirin erhielten, wurde durch den Glycoprotein I Ib/IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab aufgehoben. Die kombinierte Verwendung von Troponinen und PlGF, welche beide wesentliche Bestandteile der Pathophysiologie bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen darstellen, liefert wichtige Einblicke in die Aktivität der Erkrankung, dem kardiologischen Risiko und der Wirksamkeit einer Behandlung mittels Glycoprotein I Ib/IIIa-Hemmung durch Abciximab, welche der Verwendung eines einzelnen Markers überlegen ist.

Zusammenfassend stellt der PlGF Serumspiegel einen wirksamen und verlässlichen Biomarker der vaskulären Entzündung und negativem Ausgang in Patienten mit akuten Koronarsyndromen dar. Ein Messen der PlGF Serumspiegel erweitert die von herkömmlichen entzündlichen Markern in akuten Koronarsyndromen erhaltene prädiktive und prognostische Information signifikant.

Die Erfindung soll nun im folgenden anhand von Beispielen unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren näher erläutert werden, ohne jedoch dadurch begrenzt zu werden. In den Figuren zeigt:

**Figur 1** den Zusammenhang zwischen PlGF und hsCRP als einem stromabwärts akute-Phase Reaktanten (n = 1088).

**Figur 2** jeweils die PlGF und hsCRP Serumspiegel, gemäß dem Basislinien Troponin T Status (n = 1088).

**Figur 3** den Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration an PlGF und der Häufigkeit eines kardialen Ereignisses nach 24 Stunden, 72 Stunden, 30 Tagen und 6 Monaten in der Patientengruppe, die ein Placebo erhalten hatte (n = 547). Der Bereich der PlGF-Konzentrationen war wie folgt: unterhalb von gleich zu 13,3 ng/l (1. Quintil), 13,4 bis 19,2

ng/l (2. Quintil), 19,3 bis 27,3 ng/l (3. Quintil), 27,4 bis 40,0 ng/l (4. Quintil), und oberhalb 40,0 ng/l (5. Quintil). Die Unterschiede in den Raten eines Vorkommens zwischen den Quartilen waren signifikant bei 30 Tagen ( $p = 0,001$ ) und 6 Monaten ( $p < 0,001$ ) anschließender Untersuchung.

**Figur 4** Receiver-Operating-Charakteristia Kurvenanalyse für den prädiktiven Wert von PlGF Serumspiegeln für das Auftreten von Mortalität oder nicht-tödlichem Myokardinfarkt bei 6 Monaten Nachuntersuchung.

**Figur 5** eine Darstellung nach Kaplan-Meier der kumulativen Inzidenz von Myokardinfarkt mit tödlichem oder nicht-tödlichem Ausgang nach 72 Stunden (a) und 6 Monaten (b) gemäß den *Base Line*-Werten der PlGF-Serumspiegel (diagnostischer Schwellenwert 27,0 ng/l;  $n = 547$ ).

**Figur 6** den prädiktiven Wert von PlGF für die Inzidenz von Myokardinfarkt mit tödlichem oder nicht-tödlichem Ausgang nach hsCRP Serumspiegeln (a) und Troponin T Serumspiegeln (b). Diagnostische Schwellenwerte waren 27,0 ng/l für PlGF, 0,1 µg/l für Troponin T und 10 mg/l für hsCRP;  $n = 547$ ).

**Figur 7** den prädiktiven Wert von Entlassungs-PlGF Serumspiegeln für das Patientenergebnis bei 6-Monaten Nachuntersuchung. Patienten mit erhöhten PlGF Serumspiegeln unterlagen einem höheren kardialen Risiko, mit einer Auftrittsrate von 7,4 %, verglichen mit 2,2 % für Patienten mit PlGF Serumspiegeln unterhalb von 27,0 ng/l ( $p = 0,005$ ).

### Beispiele

PlGF wurde ursprünglich in der Plazenta identifiziert [16] und stimuliert vaskuläres glattes Muskelwachstum, rekrutiert Makrophagen in arteriosklerotischen Läsionen, reguliert die Produktion von  $\text{TNF-}\alpha$  und MCP-1 durch Makrophagen hoch und stimuliert die pathologische Angiogenese [15]. Weit wichtiger, von der Inhibierung der Effekte von PlGF durch Blockieren seines Rezeptors Tyrosinkinase Flt-1 wurde experimentell gezeigt, daß dies sowohl arteriosklerotisches Plaque-Wachstum als auch die Verwundbarkeit durch die Inhibierung der entzündlichen Zellinfiltration unterdrückt [15]. Diese Daten lassen vermuten, daß PlGF vielleicht als ein primärer inflammatorischer Anzeiger der arteriosklerotischen Plaque-Instabilität dient.

Daher wurde die prognostische Signifikanz von PlGF in Patienten mit akuten Koronarsyndromen unter der Verwendung der Daten der Patienten mit akuten Koronarsyndromen, die in die CAPTURE Untersuchung aufgenommen wurden (c7E3 „Anti Platelet Therapy in Unstable Refractory angina“), verwendet, und dann die diagnostische und prognostische Signifikanz in einer großen Patientenpopulation, die mit Schmerzen in der Brust eingeliefert wurden, vorläufig validiert. Die PlGF Serumspiegel wurden in 1088 Patienten mit akuten Koronarsyndromen aus der CAPTURE Untersuchung gemessen. Weiterhin wurde die diagnostische und prognostische Signifikanz von PlGF Serumspiegeln in einer heterogenen Gruppe von 619 Patienten mit akuten Schmerzen in der Brust vorläufig validiert. Die Inzidenz von Myokardinfarkt mit tödlichem oder nicht-tödlichem Ausgang wurde während der Folgezeit aufgezeichnet.

### Material und Methoden

#### 1. Patienten

Aufbau des Sets von Patienten mit akuten Koronarsyndromen. Die CAPTURE-Studie registrierte 1265 Patienten mit akuten Koronarsyndromen (61% männlich, im Alter von  $61 \pm 10$  years). Alle CAPTURE-Patienten klagten über wiederkehrende Brustschmerzen im Ruhezustand, assoziiert mit EKG-Änderungen während einer Behandlung mit intravenösem Heparin und Glycerintrinitrat. Die gesamte Patientenpopulation wurde vor der Randomisierung einer Koronarangiographie unterzogen, die das Auftreten einer deutlichen koronaren Arterienerkrankung mit auslösenden Läsionen von  $> 70\%$ , die für eine Angioplastie geeignet waren, signifikant aufzeigte. Heparin von vor der Randomisierung bis mindestens 1 h nach der PTCA Prozedur verabreicht. Bei allen Patienten waren innerhalb von 18 bis 24 Stunden nach Beginn der Behandlung koronare Interventionen vorgesehen. Die Patienten wurden einer Behandlung durch Abciximab oder Placebo zufallsverteilt zugeordnet. Primäre Endpunkte der Studie waren Mortalität und nicht-fataler Myocardinfarkt während der 6-Monate Nachuntersuchungsperiode [17]. Serumproben wurden 8,7 [75% CI 3,6-11,3] Stunden nach Einsetzen der Symptome entnommen.

#### 2. Validierung von Patienten mit akutem Brustschmerz

Eine separate Gruppe von 626 Patienten mit Brustschmerz (161 Frauen und 465 Männer, mittleres Alter 61 [38-82] Jahre), die in fortlaufender Reihe mit akutem Brustschmerz, der weniger als 12 Stunden (im Mittel 5,1 [2,1-10,4] Stunden) andauerte, in die Notaufnahme

kamen, wurden als Set erstellt. Nicht berücksichtigt wurden Patienten mit einer charakteristischen ST-Hebung im Basis-EKG bzw. einem dokumentierten akuten Myokardinfarkten während der vorangegangenen 2 Wochen. Serumproben wurden zum Zeitpunkt der Aufnahme (vor Beginn der Behandlung) und 4 Stunden später gewonnen, auf Eis gehalten, innerhalb von 20 Minuten nach Probennahme zentrifugiert und zur späteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Patienten wurden bis zu ihrer Entlassung aus dem Krankenhaus und 30 Tage danach beobachtet, um tödliche und nicht-tödliche Myokardinfarkte zu verzeichnen. Das Vorhandensein einer koronaren Arterienerkrankung wurde durch eines der folgenden Kriterien nachgewiesen: EKG-Anzeichen auf eine Myokard-Ischämie (neue Änderungen in der ST-Strecke oder Inversion der T-Welle), eine koronare Herzerkrankung in der Anamnese (Myokardinfarkt oder koronare Revaskularisierung, ein positiver Belastungstest oder Einengung des Durchmessers einer Hauptkoronararterie um mindestens 50% in einem früheren Angiogramm). Patienten ohne koronare Herzerkrankung hatten ein normales Koronar-Angiogramm aufzuweisen.

Primäre Endpunkte der Studie waren Mortalität, Myokardinfarkt oder die Notwendigkeit zu sofortiger Intervention (Angioplastie, *Bypass*-Operationen der Koronararterie) aufgrund einer Instabilität während 30 Tagen oder 6 Monaten. Bei Patienten, die während des Krankenhausaufenthalts einen Herzinfarkt erlitten hatten, wurde ein solcher diagnostiziert, wenn ihre Werte der Kreatinkinase-Enzymaktivität in mindestens zwei Proben mehr als dreimal so hoch waren wie die obere Grenze des Normalbereichs oder wenn ihr EKG neue deutliche Q-Zacken in mehr als zwei aufeinanderfolgenden Intervallen aufwies. Diese strikte Definition wurde gewählt, um jeden unbedeutend geringen Anstieg der Kreatinkinase nach PTCA auszuschließen. Bei Patienten mit einem Myokardinfarkt nach der Entlassung wurde ein solcher definiert, wenn ihre Werte der Kreatinkinase-Enzymaktivität mehr als doppelt so hoch waren, wie die obere Grenze des Normalbereichs oder wenn ihr EKG neue deutliche Q-Zacken in zwei oder mehr aufeinanderfolgenden Intervallen aufwies. Der sekundäre Endpunkt war die symptomatische koronare Restenose der behandelten Läsion mit einem Stenosedurchmesser  $\geq 70\%$  und die Notwendigkeit zu wiederholter Revaskularisierung während der nachfolgenden 6 Monate.

### 3. Biochemische Analyse

Serumproben wurden zentral bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Bestimmung der kardialen Marker wurde in Unkenntnis der Krankengeschichte der Patienten und der angeordneten Behandlung im

Forschungslabor der Universität Frankfurt durchgeführt. Die Serumspiegel von PlGF und VEGF wurden mittels ELISA (R&D Systems, Wiesbaden) gemessen. Zur Quantifizierung von kardialen Troponin T (TnT) wurde ein Ein-Schritt-Enzym-Immuntest auf der Grundlage der Elektrochemilumineszenz-Technologie (Elecsys 2010, Roche Diagnostics) verwendet. Hoch-sensitives C-reaktives Protein (hsCRP) wurde mit Hilfe des Behring BN II Nephelometers (Behring Diagnostics) gemessen. Ein diagnostischer Schwellenwert von 10,0 mg/l wurde verwendet [9, 18].

#### 4. Quantitative Bestimmung von PlGF

Die PlGF-Konzentration wurde unter Verwendung der Sandwich-Enzym-Immuntest-Technik (R&D Systems, Wiesbaden) bestimmt. Eine Mikrotiterplatte wurde mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch gegen PlGF gerichtet war, beschichtet. Standards und Proben wurden in die Näpfe pipettiert und vorhandenes PlGF wurde durch den immobilisierten Antikörper gebunden. Nachdem nicht-gebundenes Material gewegewaschen worden war, wurde ein Enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper, der spezifisch gegen PlGF gerichtet war, zu den Näpfen gegeben. Nach einem Waschschrift, um nicht gebundenes Antikörper-Enzym-Reagenz wegzuwaschen, wurde eine Substrat-Lösung zu den Näpfen gegeben, und die Farbe entwickelte sich im Verhältnis zur Menge an PlGF, die im ersten Schritt gebunden wurde. Die Farbentwicklung wurde abgestoppt und die Farbintensität wurde gemessen.

#### 5. Statistische Verfahren

Nach einer blinden Beurteilung der biochemischen Marker wurden die Testergebnisse mit der Datenbank abgeglichen. Um Patienten mit verschiedenen Graden eines kardiologischen Risikos unterscheiden zu können, wurde eine orientierende Datenanalyse gewählt. Das *Cox Proportional-Hazards Regression Model* wurde verwendet, um das relative Risiko für kardiovaskuläre Vorkommnisse abzuschätzen, und die Patienten wurden gemäß der PlGF-Konzentration der Quintilen eingeteilt [19]. Die Post-hoc Analyse der Quintilen wurde unter Verwendung des *Cox Proportional-Hazards Regression Model* mit den PlGF Quintilen als eine kategoriale Variable durchgeführt, und Patienten in dem ersten Quintil dienten als Referenz. *Receiver Operating Characteristics (ROC) Curve Analysis* über den dynamischen Bereich des PlGF-Tests wurde verwendet, um die Schwellenkonzentration für PlGF zu identifizieren, die den höchsten Vorhersagewert für die Risikostratifikation von Patienten mit akuten Koronarsyndromen lieferte. Der Effekt der Basislinien-Charakteristika (wobei  $p = 0,10$  erforderlich war, um eine Variable in das Model einzubringen) und anderer biochemischer



Marker auf jede beobachtete Zusammenhänge zwischen PlGF Spiegeln und kardiovaskulären Vorkommnissen wurde unter der Verwendung schrittweiser *Cox Proportional-Hazards Regression Model* durchgeführt. Alle Ergebnisse der kontinuierlichen Variablen sind als Mittel  $\pm$  Standardabweichung ausgedrückt. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde durch einen t-Test (zweiseitig) analysiert. Der Vergleich von kategorischen Variablen wurde durch den Pearson  $\chi^2$  Test generiert. p-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet. Alle Analysen wurden mit SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago) durchgeführt.

### **Beispiel 1: Zusammenhang zwischen kardialem Risiko und PlGF-Konzentration**

Die Ausgangscharakteristika der für diese Studie ausgewählten Population ( $n = 1088$ , 86% der CAPTURE-Patienten) unterschied sich nicht von der Gesamtpopulation der Studie im Hinblick auf Alter, Geschlecht, kardiovaskuläres Risikoprofil und begleitende Behandlung vor und nach der zufälligen Auswahl. Die Reduktion kardialer Ereignisse in der Abciximab-Gruppe der Population war mit der gesamten CAPTURE-Population vergleichbar sowohl vor PTCA (2,2% Placebo versus 0,9% Abciximab;  $p = 0,07$ ), als auch nach PTCA (7,9% versus 3,5%;  $p = 0,001$ ), und bei 30 Tagen (9,0% versus 4,2%;  $p = 0,001$ ) [17].

PlGF war in den *Base Line*-Serumproben von 95,6 % der Patienten der Studie, mit einem Mittelwert von 23,0 ng/l (Bereich 7,0-181,2) nachweisbar. Der PlGF Serumspiegel korrelierte nicht mit den gemessenen Konzentrationen an Troponin T ( $r = 0,14$ ) und VEGF Spiegeln ( $r = 0,07$ ), zeigte jedoch eine signifikante Korrelation mit hsCRP Serumspiegeln ( $r = 0,48$ ) (Fig. 1). Der PlGF Serumspiegel unterschied sich nicht zwischen Troponin T-positiven und Troponin T-negativen Patienten, wohingegen die hsCRP Serumspiegel in Troponin T-positiven Patienten signifikant höher waren (Fig. 2). Die Patienten der Placebo-Gruppe ( $n=547$ ) wurden nach ihren gemessenen PlGF Serumspiegeln in Quintile eingeteilt: Jeweils (PlGF 1)  $< 13,3$  ng/l ( $n = 109$ ), (PlGF 2) 13,4-19,2 ng/l ( $n = 110$ ), (PlGF 3) 19,3-27,3 ng/l ( $n = 110$ ), (PlGF 4) 27,3-40,0 ng/L ( $n = 109$ ), und (PlGF 5)  $> 40,0$  ng/l ( $n = 109$ ). Während der ersten 24 Stunden waren die kombinierten Endpunkte Mortalität und nicht-tödlicher Myokardinfarkt zwischen den PlGF-Quintilen nicht unterschiedlich ( $p = 0,11$ ) (Fig. 3). Zu späteren Zeitpunkten (72 Stunden, 30 Tage, 6 Monate) zeigten die Vorkommnis-Raten signifikante Unterschiede zwischen den PlGF Quintilen. Bei 72 Stunden Nachfolgeuntersuchung, waren die Vorkommnis-Raten in der vierten und fünften Quintile signifikant höher, wenn mit der ersten Quintile verglichen (jeweils  $p = 0,038$  und  $p = 0,011$ ). Während der anschließenden 6 Monate Nachfolgeuntersuchung, divergierten die Vorkommnis-Raten weiter, was zu signifikanten Unter-

den für die vierte und fünfte Quintile bei 30 Tagen (jeweils  $p = 0,005$  und  $p = 0,017$ ) und 6 Monate Nachfolgeuntersuchung (jeweils  $p = 0,002$  und  $p = 0,001$ ) führte.

Die *receiver operating characteristics* Kurven-Analyse bestätigte einen Schwellenwert von 27,0 ng/l für den maximierten Vorhersagewert von PlGF (Fig. 4). Auf der Grundlage dieses Schwellenwertes, wiesen 223 Patienten (40,8 %) PlGF Serumspiegel oberhalb oder gleich zu 27,0 ng/l auf, und 324 Patienten unterhalb von 27,0 ng/l. Wie *Tabelle 1* zeigt, traten geringe Unterschiede in den Ausgangscharakteristika der beiden Gruppen auf. Patienten mit erhöhten PlGF Serumspiegeln waren häufiger Diabetiker und wiesen Bluthochdruck auf und hatten signifikant höhere hsCRP Serumspiegel (*Tabelle 1*). Bei Patienten mit hohem PlGF Serumspiegel, waren die kombinierten Endpunkte tödlicher und nicht-tödlicher Myokardinfarkt signifikant verschieden von Patienten mit niedrigem PlGF Serumspiegel. Nach 72 Stunden (einschließlich koronarer Interventionen bei allen Patienten) hatten 12,1 % der Patienten mit hohem PlGF Serumspiegel ein negatives Ereignis, verglichen mit 4,9 % für Patienten mit niedrigem PlGF Serumspiegel ( $p = 0,002$ ) (Fig. 5a). Während der 6-monatigen Folgezeit divergierten die Kurven, welche die Häufigkeit eines Ereignisses anzeigen zwischen Patienten mit hohen bzw. niedrigen PlGF Serumspiegeln weiter (Fig. 5b). Signifikante Unterschiede gab es sowohl nach 30 Tagen (15,8 % versus 3,6 %;  $p = 0,001$ ) als auch nach 6 Monaten (20,3 % versus 4,9 %;  $p < 0,001$ ). Trotz der relativ niedrigen Mortalität der CAPTURE-Gruppe unterschied sich die Endpunktmortalität nach 6 Monaten signifikant zwischen den beiden Gruppen (4,0 % versus 0,9 %;  $p = 0,021$ ). In einer multivariaten Analyse, die Basislinie Charakteristika und biochemische Marker (Troponin T, VEGF, hsCRP), verblieb PlGF als ein unabhängiger wirksamer Prädiktor erhöhten kardialen Risikos sowohl bei 30 Tagen Nachfolgeuntersuchung (eingestelltes Gefahren-Verhältnis 3,34 [95 % CI 1,79 – 6,24];  $p < 0,001$ ) und bei 6 Monaten Nachfolgeuntersuchung (eingestelltes Gefahren-Verhältnis 3,58 [95 % CI 1,48 – 7,72];  $p < 0,001$ ) (*Tabelle 2*). Aufteilen der Patienten in vier Gruppen, basierend auf ihren PlGF und hsCRP Spiegel ergab, daß PlGF eine Untergruppe von Patienten mit niedrigen hsCRP Serumspiegeln identifizierte, die an einem signifikant erhöhten kardialen Risiko litten. Patienten mit niedrigem hsCRP Serumspiegel, jedoch PlGF Serumspiegeln oberhalb 27,0 ng/l wiesen ein signifikant höheres Risiko auf, als Patienten, die niedrige Spiegel für sowohl hsCRP und PlGF aufwiesen (23,6 % versus 3,9 %;  $p = 0,001$ ) (Fig. 6a).

Weiterhin war der prädiktive Wert von PlGF unabhängig von myokardialer Nekrose. Hohe PlGF Serumspiegel zeigten ein erhöhtes kardiales Risiko sowohl in Troponin T-positiven Pati-

enten (15,4 % versus 4,1 %;  $P=0,005$ ) als auch in Troponin T-negativen Patienten an (26,1 % versus 10,1 %;  $p = 0,001$ ) (Fig. 6b).

#### **Beispiel 2: Wirkung von Abciximab im Hinblick auf PlGF-Serumspiegel**

Eine logistische Regressionsanalyse wies auf einen Grenz-signifikanten Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit einer Behandlung mit Abciximab und der PlGF-Konzentrationen hin ( $p = 0,043$ ). Patienten mit erhöhten PlGF Serumspiegeln, die Abciximab erhielten hatten ein signifikant geringeres Risiko bei 30 Tage Nachfolgeuntersuchung (eingestelltes Gefahren-Verhältnis 0,38 [0,19 – 0,74];  $p = 0,005$ ). Dieser signifikante Unterschied wurde bei 6 Monaten Nachuntersuchung (0,57 [0,34 – 0,96];  $p = 0,037$ ) beibehalten. Im Unterschied dazu erhielten Patienten mit niedrigen PlGF Serumspiegeln keinen signifikant therapeutischen Vorteil von einer Behandlung mit Abciximab (30 Tage Nachfolgeuntersuchung: eingestelltes Gefahren-Verhältnis 0,59 [0,27 – 1,33];  $p = 0,23$ ).

#### **Beispiel 3: Entlassungs PlGF Serumspiegel sind für den Langzeitausgang prädiktiv**

Eine zweite Blutprobe, die vor der Entlassung abgenommen wurde ( $7,2 \pm 4,5$  Tage nach Randomisierung), war für 489 Patienten der 547 Placebo-Patienten erhältlich (89,4%). Die PlGF Serumspiegel nahmen von einem Mittel von  $27,12 \pm 19,56$  ng/l bei Basislinie auf  $23,4 \pm 26,2$  ng/l bei Entlassung ab ( $p = 0,012$ ). Für Patienten mit einem PlGF Serumspiegel oberhalb 27,0 ng/l bei Entlassung war das Auftreten von Mortalität und nicht-fatalem myokardialen Infarkt signifikant höher, wenn mit Patienten mit niedrigem PlGF Serumspiegel verglichen, sowohl bei 30 Tage (4,6 % versus 0,8 %;  $p = 0,019$ ) und 6 Monate Nachfolgeuntersuchung (7,4 % versus 2,2 %;  $p = 0,005$ ) (Fig. 7).

#### **Beispiel 4: Validierung des PlGF-Schwellenwerts in Patienten mit akuten Brustschmerzen**

Von 626 Patienten mit akuten Brustschmerzen, litten 308 Patienten an einem akuten Koronarsyndrom (117 Patienten hatten einen nicht-ST-Erhöhung myokardialen Infarkt). Die anderen Patienten wurden den folgenden Diagnosen zugeteilt:  $n = 91$  stabile Angina,  $n = 10$  pulmonare Embolie,  $n = 11$  kongestives Herzversagen,  $n = 7$  Myokarditis, und  $n = 199$  kein Hinweis auf Herzerkrankung. Die PlGF Serumspiegel waren in Patienten mit akuten Koronarsyndromen signifikant erhöht (Mittel 28,3 [95 % CI 21,3 – 2,2] ng/l), wenn jeweils mit Patienten mit stabiler Angina verglichen (Mittel 16,2 [95 % CI 13,8 – 18,6 ng/l;  $p = 0,001$ ), und Patienten ohne Anzeichen auf Herzerkrankung (Mittel 9,6 [95 % CI 10,4 – 12,9 ng/l;  $p = 0,001$ ). Die

PIGF Serumspegel in Patienten mit nicht-ST-Erhöhung myokardialen Infarkt unterschieden sich nicht signifikant von PIGF Serumspegeln in Patienten mit instabiler Angina (30,5 [95 % CI 26,9 – 34,1] versus 28,3 [95 % CI 21,3 – 32,2] ng/l;  $p = 0,42$ ) Die 97,5 Prozent obere Referenzgrenze in Patienten ohne Hinweis auf Herzerkrankung war 24,9 ng/l und die 99 Prozent obere Referenzgrenze war 27,3 ng/l. Der PIGF Serumspegel korrelierte nicht mit Markern der Nekrose (Troponin T [ $r = 0,07$ ]), korrelierte jedoch signifikant mit Entzündungsmarkern (C-reaktivem Protein [ $r = 0,43$ ]).

In Patienten mit akuten Koronarsyndromen, wiesen 44,8 % der Patienten PIGF Serumspegel oberhalb der 99 Prozent obere Referenzgrenze auf. Unter der Verwendung des Schwellenwerts für PIGF von 27,0 ng/l, unterlagen Patienten mit erhöhtem PIGF Serumspegel einem signifikant höheren Risiko für Tod und myokardialen Infarkt (eingestelltes Gefahren-Verhältnis 2,97 [95 % CI 1,74 bis 9,06;  $p = 0,014$ ]). Innerhalb der gesamten heterogenen Population von Patienten mit Brustschmerzen identifizierte der Schwellenwert von 27,0 ng/l auch zuverlässig Patienten, die dem höchsten Risiko für Tod und myokardialen Infarkt ausgesetzt waren (eingestelltes Gefahren-Verhältnis 4,95 [95 % CI 2,50 to 9,79;  $P0.001$ ]).

#### Zusammenfassung der Beispiele

In Patienten mit ACS, korreliert PIGF nicht mit VEGF, Troponin T, und ST-Segment Veränderungen, zeigte jedoch eine signifikante Korrelation mit hsCRP ( $p = 0,001$ ). Patienten mit erhöhtem PIGF Serumspegel ( $> 27,0$  ng/l; 40,8 %) erfuhren ein erheblich erhöhtes kardiales Risiko (Tod und nicht-fataler myokardialer Infarkt) sowohl bei 30 Tagen (eingestelltes Gefahren-Verhältnis 3,34 [95 % CI 1,79 – 6,24];  $p = 0,001$ ) und bei 6 Monaten (eingestelltes Gefahren-Verhältnis 3,58 [95 % CI 1,48 - 7,72];  $p = 0,001$ ) nach ACS. Die PIGF Serumspegel waren spezifisch in Patienten mit niedrigen hsCRP Spiegeln informativ. Die vorläufige Validierung in Patienten mit akuten Brustschmerzen ergab, daß PIGF Serumspegel  $> 27$  ng/l identifizierte zuverlässig diejenigen Patienten, die dem höchsten Risiko für Tod und myokardialen Infarkt (eingestelltes Gefahren-Verhältnis 4,95 [95 % CI 2,50 bis 9,79;  $p = 0,001$ ]) ausgesetzt waren. Das erhöhte Risiko in Patienten mit high PIGF Serumspegel wurde durch die Behandlung mit dem Glycoprotein IIb/IIIa Rezeptorinhibitor Abciximab verringert (eingestelltes Gefahren-Verhältnis 0,38 [0,19 – 0,74];  $p = 0,005$ ).

**Tabelle 1:** *Base Line*-Charakteristika gemäß dem PIGF Status für die Placebogruppe des CAPTURE Versuchs (n = 547)

	PIGF niedrig	PIGF hoch	p-Wert
n	324	223	
männlich	71,4 %	69,2 %	0,34
Alter	61,4 ± 10,5	62,3 ± 10,5	0,32
Troponin T ≥ 0,1 µg/l	33,8 %	40,4 %	0,12
CRP ≥ 10,0 µg/l	29,1 %	67,7 %	< 0,001
ST-Segment Depression	46,0 %	52,1 %	0,18
T-Wellen Inversion	51,4 %	52,1 %	0,93
Vorgeschichte von			
Angina > 4 Wochen	55,3 %	57,4 %	0,64
Infarkt < 30 Tage	12,5 %	13,6 %	0,84
Infarkt > 30 Tage	20,3 %	20,4 %	0,97
PTCA	16,5 %	18,4 %	0,56
CABG	3,2 %	3,7 %	0,88
Risikofaktoren			
Diabetes	8,2 %	12,5 %	0,034
Bluthochdruck	33,4 %	39,9 %	0,019
akuter Raucher	39,6 %	41,8 %	0,48
Medikation vor Registrierung			
Aspirin	97,9 %	98,1 %	1,00
Heparin i.v.	99,0 %	98,9 %	0,98
Nitrate i.v.	99,4 %	99,3 %	1,00
Beta-Blocker	63,5 %	62,9 %	0,91

**Tabelle 2:** Multivariantes Cox proportionales-Gefahren-Regressionsmodell für tödlichen und nicht-tödlichen Myokardinfarkt innerhalb der ersten 6 Monate der Nachuntersuchung, abgeleitet von der Placebogruppe der CAPTURE Untersuchung

Variable	eingestelltes Gefah- ren-Verhältnis	95% CI	p-Wert
Geschlecht	0,95	0,72 bis 1,68	0,38
Alter > 65 Jahre	1,22	0,65 bis 1,47	0,50
Diabetes mellitus	1,22	0,83 bis 1,49	0,61
Hypercholesterinämie	0,90	0,68 bis 1,13	0,59
Akuter Raucher	0,66	0,42 bis 1,25	0,18
Bluthochdruck	1,04	0,91 bis 1,25	0,95
Geschichte einer Koronar- Revaskularisierung	0,86	0,65 bis 1,19	0,72
ST-Senkung	0,96	0,55 bis 1,42	0,81
hsCRP > 10,0 mg/l	0,95	0,62 bis 1,57	0,88
Troponin T > 0,1 µg/l	1,76	0,98 bis 3,46	0,084
VEGF > 300 ng/l	2,16	1,05 bis 4,11	0,031
PIGF > 27,0 ng/l	3,58	1,48 bis 7,72	< 0,001

## Literaturliste

1. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(9):1135-43.
2. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
3. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985;53(4):363-73.
4. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91(11):2844-50.
5. Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990;65(3):168-72.
6. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331(7):417-24.
7. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996;94(5):874-7.
8. Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999;99(7):855-60.
9. Heeschen C, Hamm CW, Bruemmer J, Simeons ML. Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 AntiPlatelet Therapy in Unstable angina refractory to standard treatment trial. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(6):1535-42.
10. Morrow DA, Rifai N, Antman EM, et al. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently of and in combination with troponin T in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. *Thrombolysis in Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol* 1998;31(7):1460-5.

11. Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *Circulation* 1997;96(12):4204-10.
12. Biasucci LM, Liuzzo G, Colizzi C, Rizzello V. Clinical use of C-reactive protein for the prognostic stratification of patients with ischemic heart disease. *Ital Heart J* 2001 ;2(3): 164-71.
13. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein and its role in the pathogenesis of myocardial infarction. *Ital Heart J* 2001;2(11):804-6.
14. Liuzzo G, Biasucci LM, Rebuszi AG, et al. Plasma protein acute-phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation* 1996;94(10):2373-80.
15. Luttun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8(8):831-40.
16. Maglione D, Guemero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(20):9267-71.
17. CAPTURE. Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE Study. *Lancet* 1997;349(9063): 1429-35.
18. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2000;343(16): 1139-47.
19. Cox DR. Regression models and life-tables. *JR Stat Soc [B]* 1972;34:187-220.



20. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000;342(9):626-33.
21. Khaliq A, Dunk C, Jiang J, et al. Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction. *Lab Invest* 1999;79(2):151-70.
22. Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* 1996;98(11):2507-11.
23. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Boersma E, Zeiher AM, Simoons-Sel ML. Prognostic significance of angiogenic growth factor serum levels in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;107:524-530.
24. Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* 2000;102(1):118-22.
25. Liuzzo G, Baisucci LM, Gallimore JR, et al. Enhanced inflammatory response in patients with preinfarction unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(6): 1696-703.
26. Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, et al. Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. *Circulation* 1998;98(22):2370-6.
27. Liuzzo G, Angelillo DJ, Buffon A, et al. Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide-challenge in patients with recurrent unstable angina. *Circulation* 2001;103(18):2236-41.
28. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997;349(9069):1912-3.

29. Luttun A, Tjwa M, Canneliet P. Placental Growth Factor (PlGF) and Its Receptor Flt-1 (VEGFR-1): Novel Therapeutic Targets for Angiogenic Disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2002;979:80-93.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von biologischen Proben in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:
  - (a) Gewinnung einer zu untersuchenden biologischen Probe von einem Patienten;
  - (b) Inkubieren der Probe mit einem oder mehreren Molekülen, die spezifisch an PlGF binden;
  - (c) Nachweisen und/oder quantifizieren von PlGF in der Probe unter Verwendung immunologischer Methoden; und
  - (d) Vergleichen des für die zu untersuchende Probe erhaltenen Ergebnisses mit einem Referenzwert und/oder dem Ergebnis einer Referenzprobe.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die zu untersuchende Probe und/oder die Referenzprobe aus einem Säugetier, insbesondere aus dem Menschen, stammt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die zu untersuchende Probe ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus peripherem Blut oder Fraktionen davon und Zellkultur-Suspensionen oder Fraktionen davon.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die zu untersuchende Probe Serum ist.
5. Verfahren nach Anspruch 3, wobei dem peripheren Blut ein Gerinnungshemmer, insbesondere Heparin, zugesetzt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die an PlGF bindenden Moleküle ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus anti-PlGF-Antikörpern oder Teilen davon und PlGF-Rezeptoren oder Teilen davon.
7. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Antikörper, Teile oder Fragmente davon polyclonale Antikörper, monoklonale Antikörper, Fab-Fragmente, scFv-Fragmente und Diabodies umfassen.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei PlGF und/oder die an PlGF bindenden Moleküle in Lösung oder Matrix-immobilisiert vorliegen.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die an PlGF bindenden Moleküle an eines oder mehrere Nachweisgruppen aus der Gruppe bestehend aus Fluorescein-thioisocyanat, Phycoerythrin, einem Enzym und magnetisches Bead gekoppelt sind.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die an PlGF bindenden Moleküle mit einem Antikörper, an den eine oder mehrere Nachweismoleküle gekoppelt sind, nachgewiesen werden.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die immunologischen Verfahren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Sandwich-Enzym-Immuntest, ELISA und Festphasen-Immuntests.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Referenzwert  $> 24,9$  ng/l, und insbesondere  $> 27,0$  ng/l bis  $> 27,3$  ng/l beträgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die kardiovaskulären Erkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus stabiler und instabiler Angina, Myokardinfarkt, aktuellem Herzsyndrom, koronarer Arterienerkrankung und Herzinsuffizienz.
14. Diagnostischer Kit, umfassend Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Komponenten und/oder Hilfsstoffen.
15. Diagnostischer Kit nach Anspruch 14, umfassend Gold-markierte polyklonale Maus-Indikatorantikörper, biotinylierte polyklonale Nachweisantikörper und eine Testvorrichtung, umfassend ein Fiberglas-Vlies.
16. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Diagnose und/oder Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen und/oder zur Überwachung von deren Therapie.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Therapie die Verabreichung von Inhibitoren des Flt-1-Rezeptors umfaßt.
18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, wobei die Therapie die Verabreichung eines Glycoprotein IIb/IIIa-Inhibitors umfaßt, insbesondere Abciximab.

### **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft Plazentalen-Wachstumsfaktor (PlGF) einen neuen Marker der vaskulären Entzündung als Werkzeug zur Diagnose und deren Prognose in Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen. Der Marker dient weiterhin als ein Werkzeug, das die Auswahl von Wirkstoffen zur Behandlung solcher Erkrankungen erleichtert und schließlich als Ansatzpunkt für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Erstellung eines individuellen Risikoprofils von negativen Vorgängen, die mit dem Fortschreiten der Arteriosklerose zusammenhängen.

Fig. 1

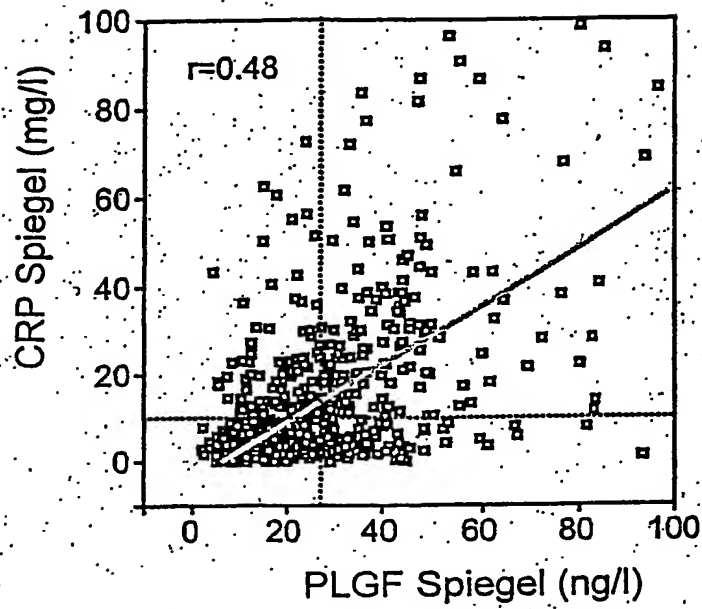


Fig. 2

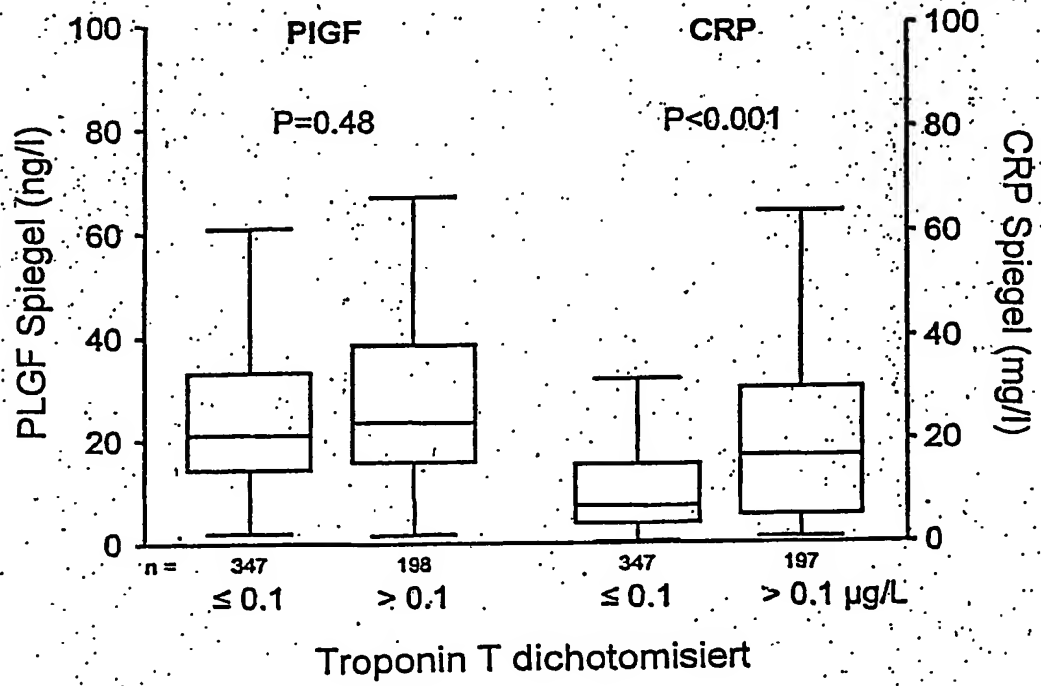


Fig. 3

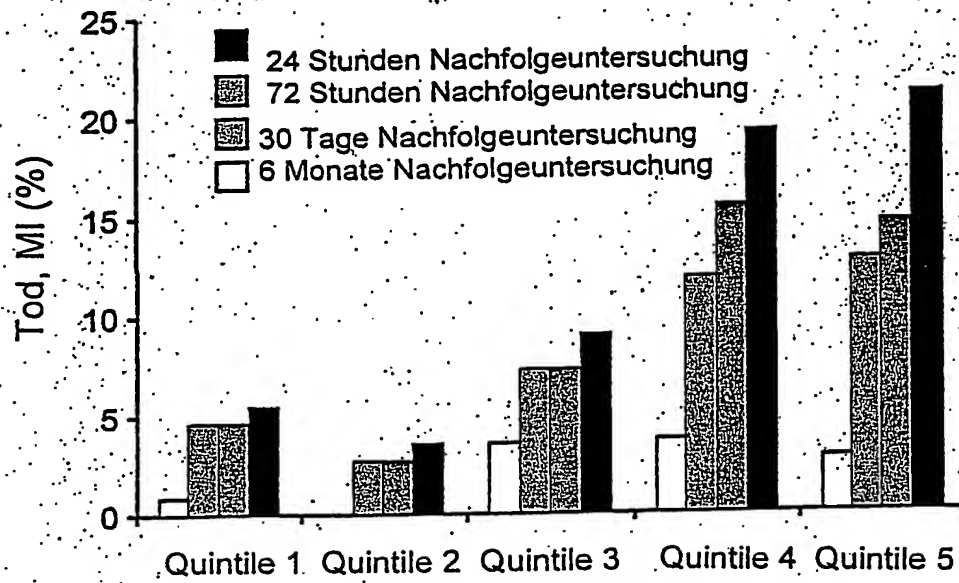


Fig. 4

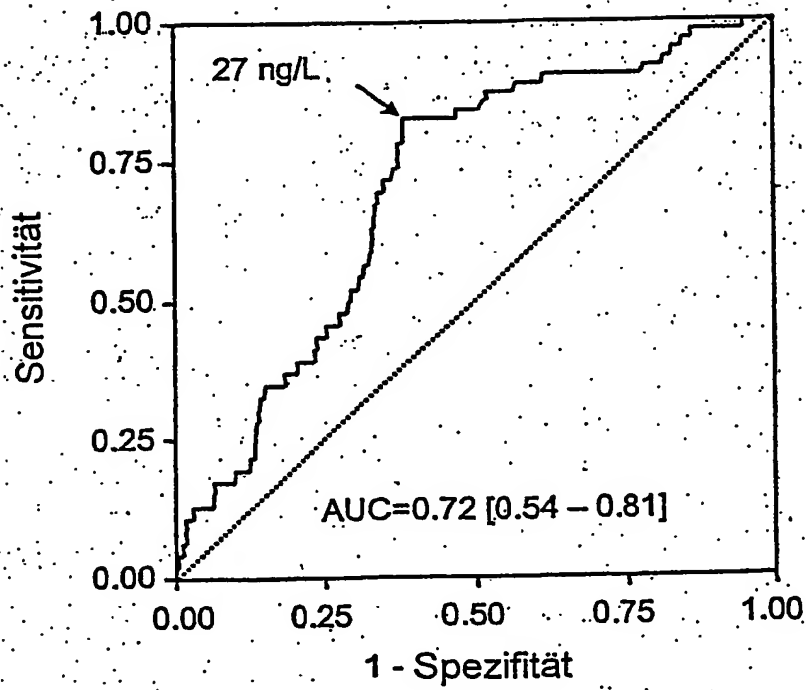




Fig. 5a

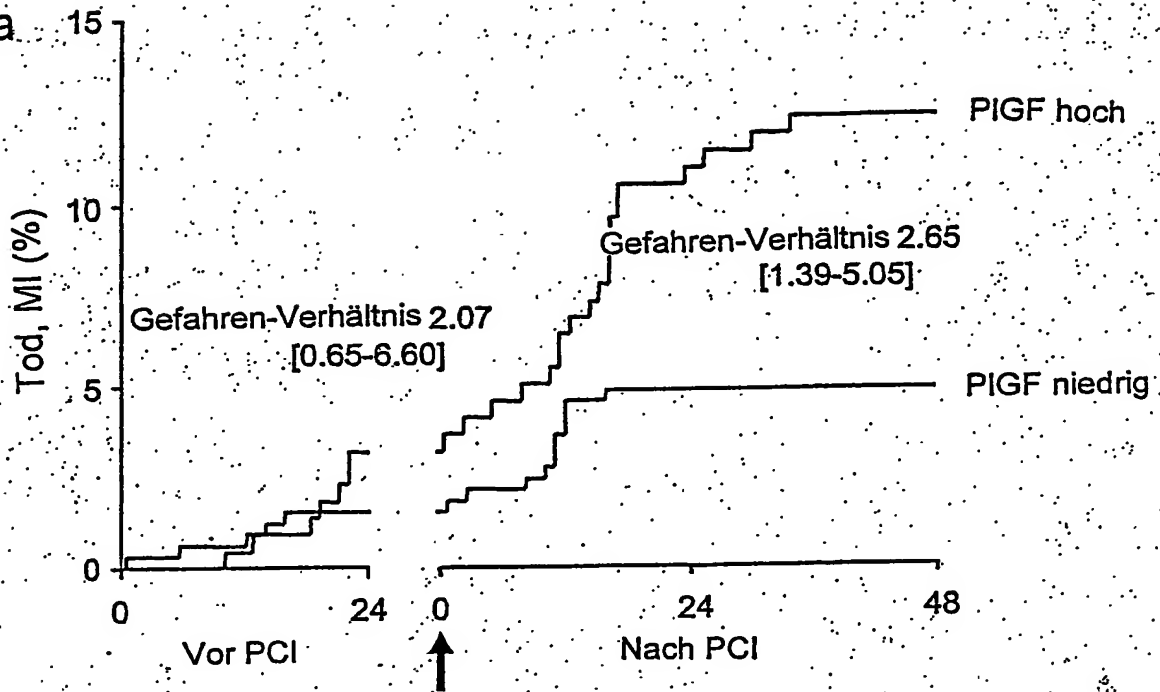


Fig. 5b

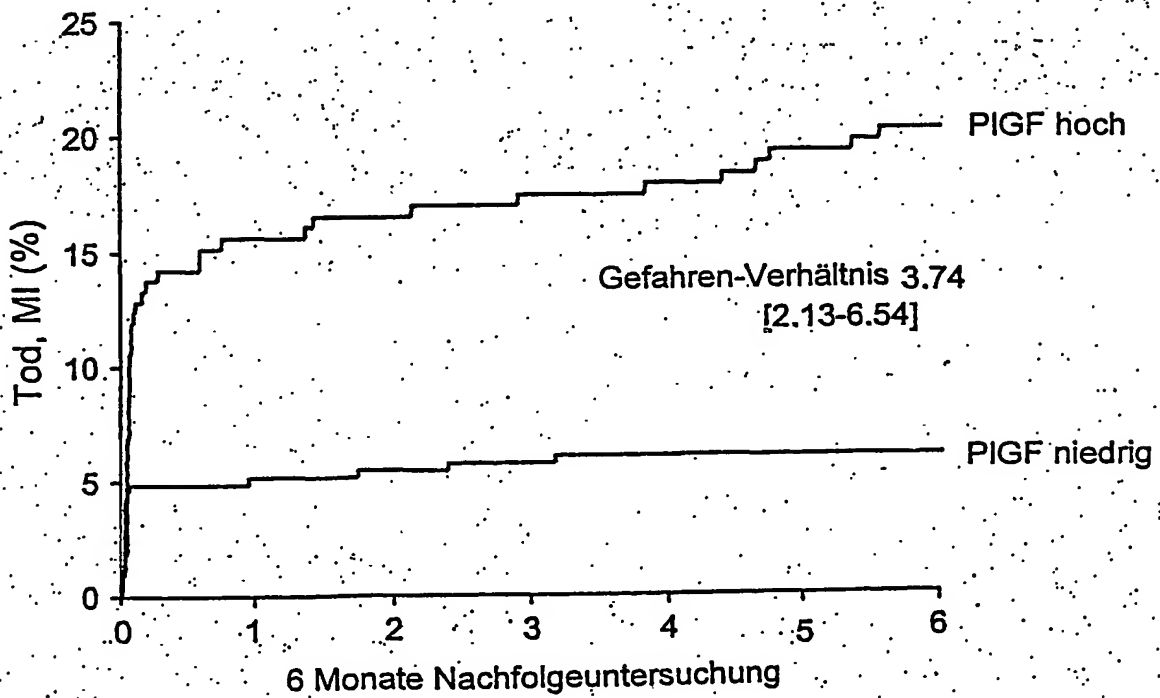


Fig. 6a

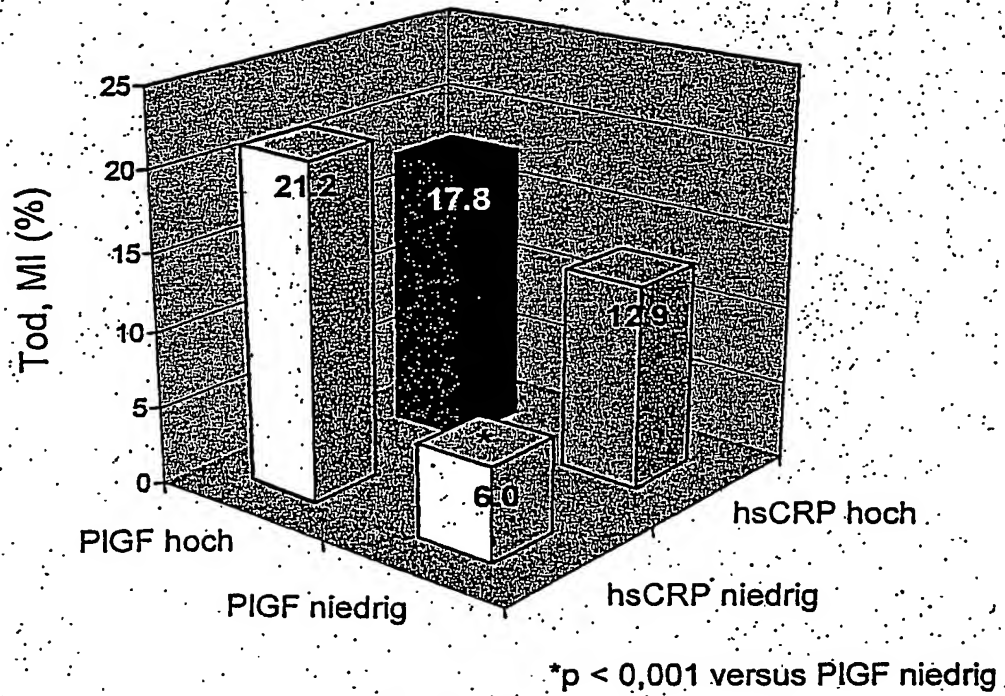


Fig. 6b

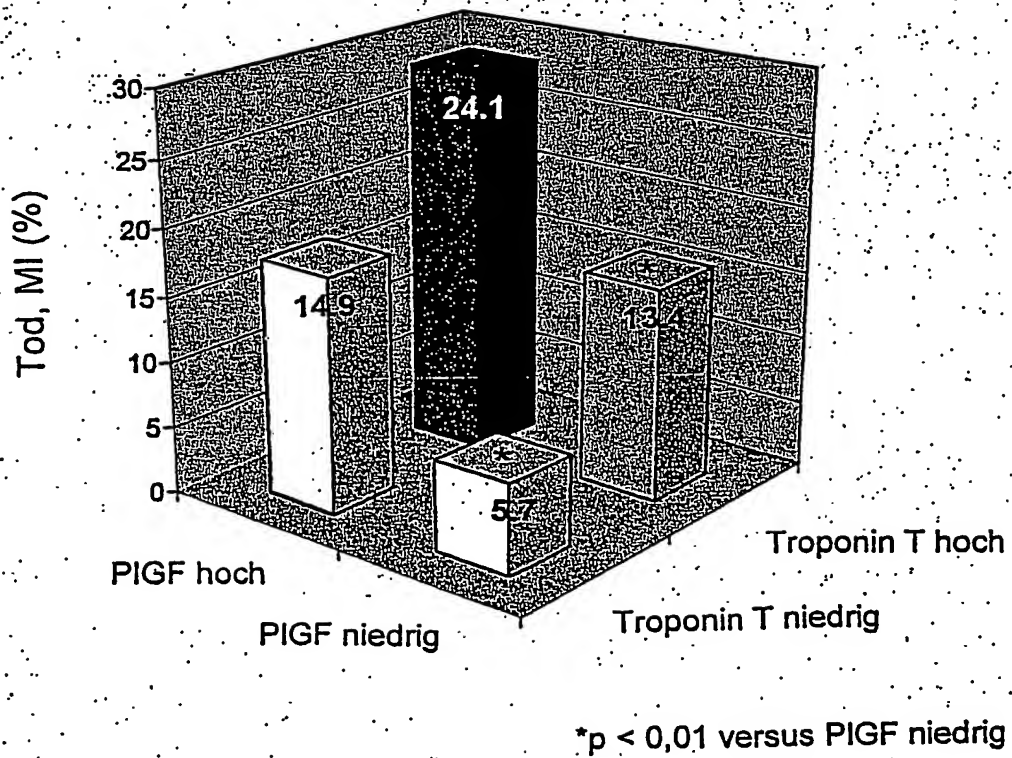
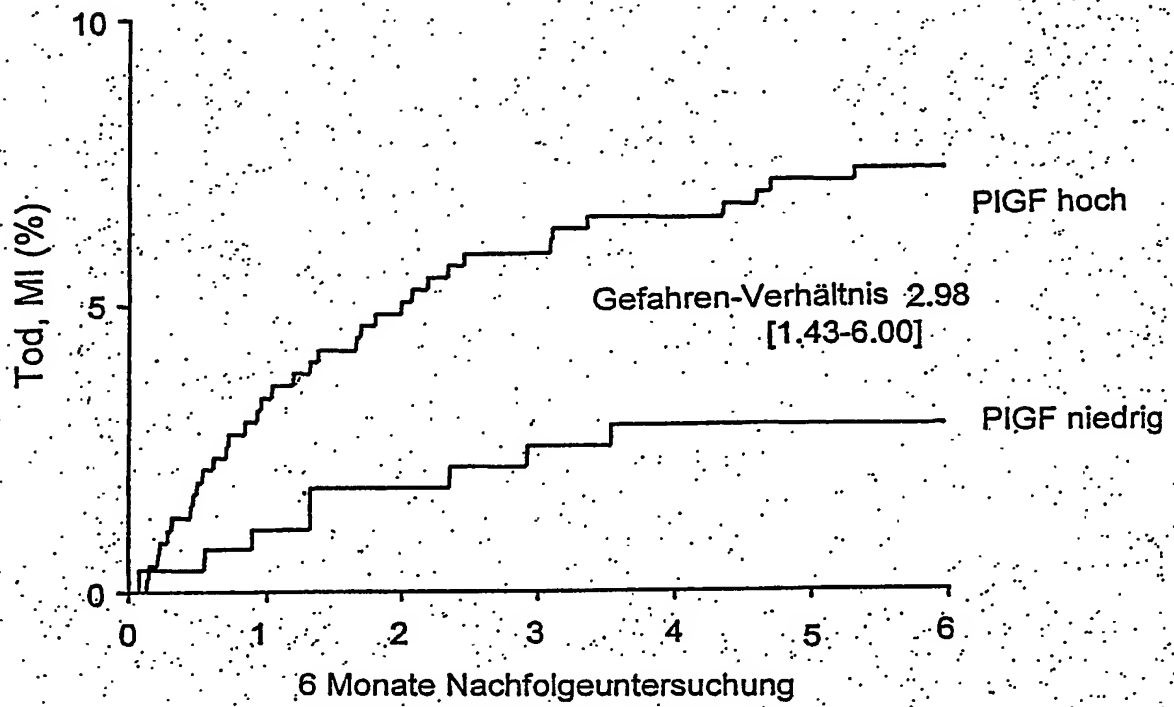


Fig. 7



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**